



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

DANIEL LIMA MENEZES

AVALIAÇÃO DOS ESTUDOS DE COORTE SOBRE NOVOS
MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS EM LEUCEMIAS
MIELOIDES AGUDAS

SÃO CRISTÓVÃO

2016

DANIEL LIMA MENEZES

**AVALIAÇÃO DOS ESTUDOS DE COORTE SOBRE NOVOS
MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS EM LEUCEMIAS
MIELOIDES AGUDAS**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado como
requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharelado em Farmácia, pela Universidade
Federal de Sergipe, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a
Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima

SÃO CRISTÓVÃO

2016

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS: LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	5
2.2. IMUNOMARCADORES EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	10
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. OBJETIVO GERAL	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. METODOLOGIA.....	18
4.1. REVISÃO SISTEMÁTICA	18
4.1.1. ESTRATÉGIA DE BUSCA.....	18
4.1.2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ESTUDOS INDIVIDUAIS	20
4.1.3. COLETA DE DADOS.....	20
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	21
5.1. A PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	21
5.2. CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS.....	22
5.3. A INFLUÊNCIA DOS MARCADORES NO PROGNÓSTICO E NA SOBREVIVÊNCIA GLOBAL.....	24
5.3.1. CD87.....	24
5.3.2. CD135.....	25
5.3.3. CXCR4	26
5.3.4. CD133.....	28
5.3.5. TRAILR2 (CD262), TRAILR3 (CD263) e TNFR1	29
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
7. REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

Neoplasias hematológicas são doenças decorrentes de alterações genéticas e metabólicas nas células hematopoéticas, aumentando desordenadamente a proliferação e impedindo a morte celular. As leucemias agudas são neoplasias hematológicas caracterizadas pelo descontrole na multiplicação, maturação e apoptose das células jovens (blastos) na medula óssea e/ou sangue periférico. Sua classificação está ligada ao tipo de linhagem afetada em mieloide ou linfoide, e evolução clínica em aguda ou crônica (RAJABLI et al., 2013; ALLEGRA et al., 2016).

As leucemias mieloides agudas (LMAs) compõem um grupo heterogêneo de neoplasias, incidentes em homens acima dos 65 anos, com sobrevida global entre 2 a 5 anos e prognóstico desfavorável. Seu desenvolvimento está ligado a mutações em genes, denominados oncogenes, envolvidos na hematopoese, levando à proliferação de blastos mieloides leucêmicos, suprimindo a produção das demais linhagens celulares, resultando em anemia, sangramentos, infecções recorrentes e falência da medula óssea. As mutações genéticas são identificadas em mais de 97% dos casos e muitas vezes na ausência de grande anormalidade cromossômica (KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016; STEPHEN et al., 2016).

A leucemia mieloide aguda é uma das leucemias mais comuns que acometem adultos, do sexo masculino com média de 65 anos e são resultados de transformações em células progenitoras devido a alterações gênicas que produzem o desequilíbrio em sua proliferação e diferenciação. É uma doença heterogênea e de mal prognóstico, com sobrevida global média de dois a cinco anos (GALLIPOLI et al., 2016; STEPHEN, et al., 2016). Sua incidência mundial é de 2 a 3 casos por 100.000 pessoas ao ano (SOUTO et al., 2013).

O diagnóstico das leucemias mieloides agudas inicia pela suspeita clínica, seguida da avaliação morfológica do sangue periférico e da medula óssea, da citogenética e avaliação imunofenotípica. A imunofenotipagem por citometria de fluxo é um instrumento fundamental na detecção de múltiplas características celulares, de forma simultânea, através de anticorpos monoclonais utilizados como marcadores imunofenotípicos na expressão de antígenos (*Clusters Designations* - CDs). Esta detecção pode estar correlacionada com o prognóstico e sobrevida dos pacientes com LMAs. Existem marcadores preconizados em painéis de triagem para as LMAs a mais de 20 anos. Neles, os imunomarcadores mais utilizados são CD13, CD33, CD34, HLA-DR, CD117 e CD49. Apesar da vasta identificação desses CDs, a avaliação de novos

marcadores pode auxiliar no direcionamento de uma terapia mais precisa para estas doenças (TERWIJN et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2015).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS: LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

As neoplasias hematológicas são doenças em que existe a perda do controle sobre a proliferação e morte das células sanguíneas através mutações genéticas. As mutações em genes (oncogenes) ocorrem em células que regulam os estímulos de proliferação celular e os de apoptose, onde promovem perturbações nos mecanismos metabólicos celulares, modificando os sinais de transdução, promovendo o desequilíbrio celular. Por exemplo, o oncogene STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), que está ligado a autoregulação da transcrição de genes influencia na sobrevivência das células neoplásicas, na resistência a apoptose e na progressão do ciclo dessas células (ALLEGRA et al., 2016; KRAUSE; SCADDEN, 2016).

Dentre as neoplasias, as leucemias são 9ª tipo de câncer mais comum em homens e o 10º em mulheres. Os fatores de risco que levam a esta doença são variados. Entre eles estão a terapia com quimioterápicos, exposição à radiação, substâncias tóxicas como benzeno e derivados e pré-disposição genética são os mais comuns. Tem por característica o acúmulo de células jovens sem função que se proliferam de forma exacerbada e impedem a produção de células funcionais, causando sintomas como anemia pela diminuição na produção de hemácias, sangramentos pela diminuição de plaquetas e suscetibilidade a infecções recorrentes pela diminuição de leucócitos. As leucemias são subdivididas dependendo da linhagem ao qual a doença desenvolva, podendo ser mieloide ou linfóide e da sua evolução clínica, em agudas e crônicas, com quatro grandes grupos: leucemias mieloides agudas, leucemias mieloides crônicas, leucemias linfóides agudas e leucemias linfóides crônicas (RAJABLI et al., 2013; FU et al., 2014)

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer informou que a estimativa para 2016 seja de 10.070 novos casos, sendo 5.540 em homens e 4.530 em mulheres. Em Sergipe, é possível verificar a estimativa de leucemias maior em mulheres do que homens na figura 1.

As mutações ocorridas por oncogenes nas leucemias mieloides agudas modificam as vias de proliferação (conhecidas como mutações de classe I) e as vias de diferenciação e apoptose (conhecidas como mutações de classe II). As transformações genéticas mais recorrentes são FLT3-ITD (FLT3 - *fms related tyrosine kinase* 3, *internal tandem duplication* - ITD), NPM1 (*Nucleophosmin* 1) e CEBPA (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*), translocações e inversões como t(8;21), t(15;17), inv(16)(p13.1q22) e inv(3)(q21.3q26.2), dentre outras, que ajudam a definir o prognóstico individual da doença e seus derivados subtipos (KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016).

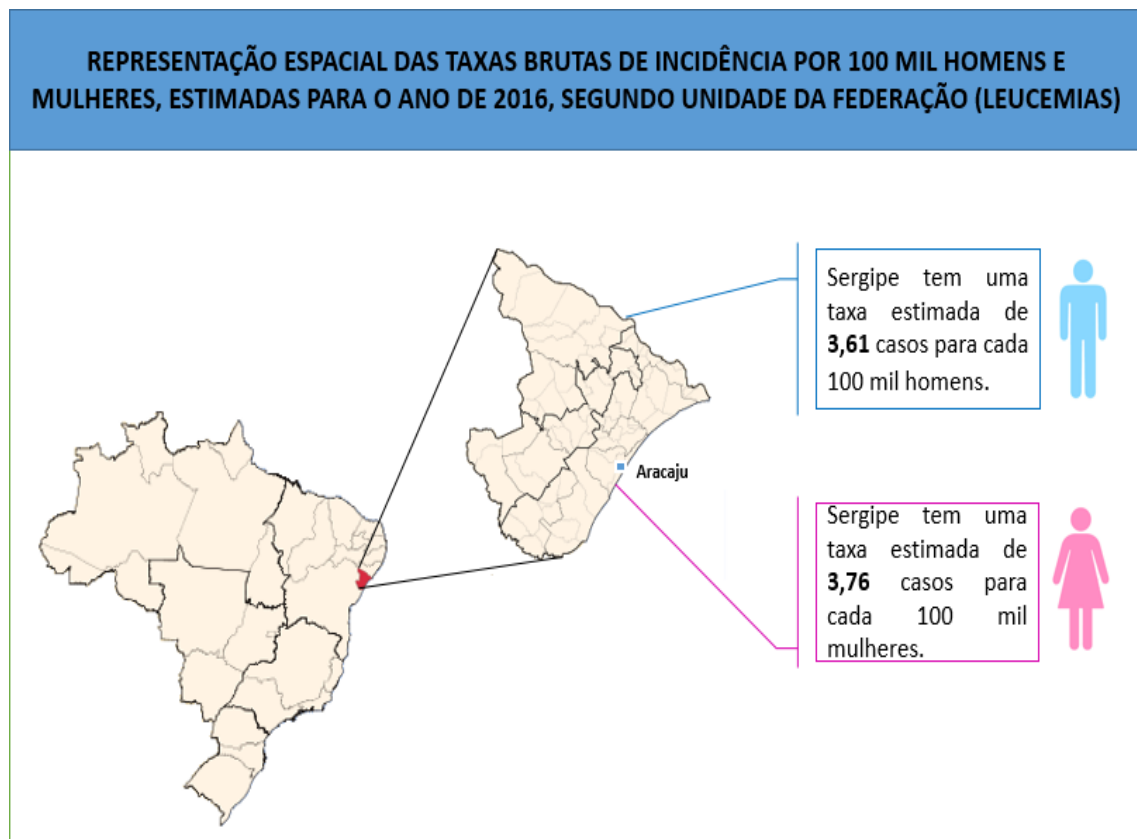


Figura 1: Incidência de leucemia no estado de Sergipe em homens e mulheres.

Fonte: Modificado de <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/mapa.asp?ID=8>

Assim como algumas neoplasias, as leucemias mieloides agudas surgem através de sintomas inespecíficos como febre, perda de peso, astenia, fadiga, falta de ar, fraqueza muscular, dores nas articulações, hepatoesplenomegalia, aumento de linfonodos e suores noturnos. Tais sintomas ocorrem devido à supressão de medula óssea pelas células neoplásicas, acarretando a diminuição na produção de hemácias, leucócitos e plaquetas saudáveis. Outros sinais clínicos podem ser vistos, como palidez,

dor óssea, hipertrofia gengival, petéquias, equimoses e infiltrações cutâneas (TOLBA et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2015).

Os achados clínicos são vistos no hemograma, através da contagem diferencial de leucócitos com anormalidades, variando entre $< 1.000/\mu\text{L}$ a $200.000/\mu\text{L}$ e presença blastos, neutropenia, baixa dosagem de hemoglobina, anemia normocrômica e normocítica e trombocitopenia, que pode ser severa (KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016).

A maioria das causas que levam ao desencadeamento das leucemias mieloides agudas são desconhecidas. Alguns fatores de risco podem desenvolver a doença, como mutações genéticas derivadas de tratamentos com agentes alquilantes, radiações ionizantes e exposição à agentes químicos derivados do benzeno. Alguns vírus como o HTLV1 (*human T-lymphotropic virus 1*) e doenças precursoras como as síndromes mielodisplásicas também são relatadas dentre as causas. Independente do mecanismo utilizado para a mutação genética de origem, acredita-se em uma progressão gradual de fatores que evoluam a doença ao desregularem tanto a proliferação celular quanto à sua diferenciação e apoptose (KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2015; PEREIRA; MESQUITA, 2015).

Desde o descobrimento das leucemias, diversas propostas de classificações surgiram durante os anos. Hoje, as duas classificações mais aceitas e utilizadas no mundo são do grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), atualizada em 2016. A FAB foi a primeira classificação utilizada para as LMAs, focando inicialmente na morfologia, citoquímica e a presença de 30% de blastos na medula óssea como critérios de classificação. Em 1985 foi incluído a utilização de marcadores monoclonais como método imunofenotípico, extratificando as LMAs nos subtipos M0 a M7, como mostra a figura 2 (ROSE-INMAN; KUEHL, 2014).

A classificação da Organização Mundial da Saúde, publicada em 2001, utilizava os critérios morfológicos e imunohistoquímicos, incluindo recentemente o uso da imunofenotipagem, avaliação de alterações genéticas e moleculares. Em sua última atualização (2016) entidades provisórias foram adicionadas como a LMA de *B cell receptor-abelson murine leukemia viral oncogene 1* (BCR-ABL1), entidades específicas na classificação das LMAs tal como sarcoma mieloide, e outras neoplasias mieloides, abordando seus eventos moleculares e anormalidades em seus subtipos e doenças específicas, mostrado no quadro 1 (ARBER et al., 2016).

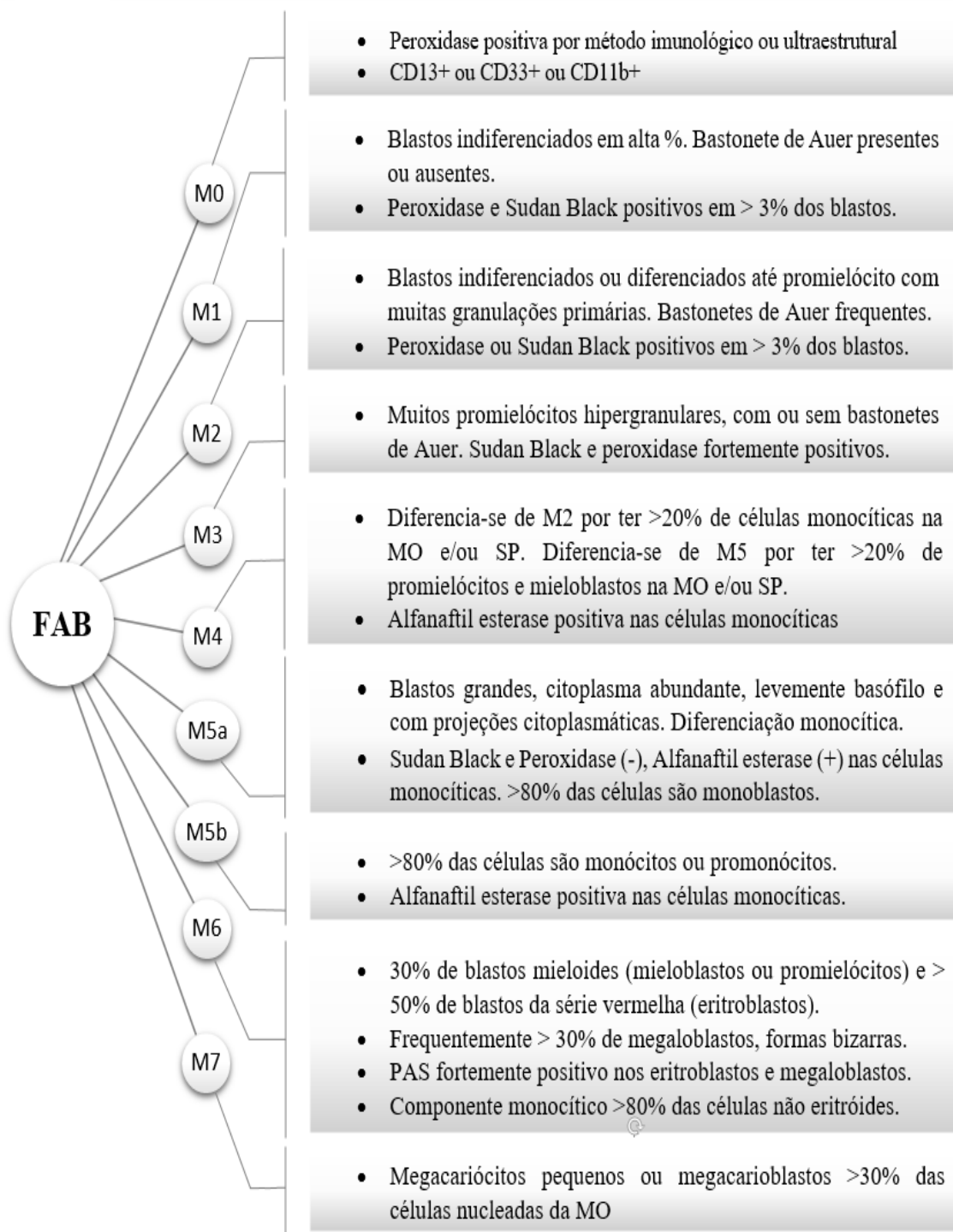


Figura 2: Classificação do grupo Franco-Americano-Britânico para as leucemias mieloides agudas.

MO: medula óssea; SP: sangue periférico; (+): positivo; %: porcentagem; PAS: Ácido periódico de Schiff. Fonte: Adaptado de BAIN; ESTCOURT, 2013.

Quadro 1 – Classificação da Organização Mundial da Saúde para as leucemias mieloides agudas.

TIPO DE LMA	SUBTIPO DE LMA
LMAs com anormalidades genéticas recorrentes	LMA com t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1 LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 LPA com PML-RARA LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A LMA com t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214 LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 Entidade provisória: LMA com BCR-ABL1 LMA com mutação NPM1 LMA com mutações bialélicas de CEBPA Entidade provisória: LMA com mutação RUNX1
LMAs com alterações relacionadas à mielodisplasia	- Com síndrome mielodisplásica pregressa - Sem síndrome mielodisplásica pregressa
Neoplasias mieloides relacionadas à terapia (NM-T)	- Relacionados a agentes alquilantes - Relacionados ao inibidor da topoisomerase II - Outros tipos
LMAs sem outra especificação (LMA, SOE)	-LMA pouco diferenciada -LMA sem maturação -LMA com maturação -Leucemia mielomonocítica aguda -Leucemia monoblástica e monocítica aguda -Leucemia eritroide pura -Leucemia megacariocítica aguda -Leucemia basofílica aguda -Pan-mielose com mielofibrose aguda
Sarcoma mieloide	
Leucemias agudas de linhagem ambígua	-Leucemia aguda indiferenciada -Leucemia aguda de fenótipo misto (LAFM) com t (9; 22) (q34.1; q11.2); BCR-ABL1 -LAFM com T (V; 11q23.3); KMT2A reorganizados -LAFM, B / mieloide, sem outra especificação -LAFM, T / mieloide, sem outra especificação
Proliferações mieloides relacionadas com a síndrome de Down	Mielopoese anormal transitória (MAT) Leucemia mieloide associada com síndrome de Down
Neoplasias de células dendríticas plasmocitóides blásticas	

LMA: leucemia mieloide aguda; RUNX1: *Runt-related transcription fator 1*; RUNX1T1: *Runt-related transcription fator 1 Translocation partner 1*; CBFB-MYH11: *core-binding factor beta subunit-myosin heavy chain 11*; LPA: leucemia promielocítica aguda; PML-RARA: *promyelocytic leucemia protein-retinoic acid receptor alpha*; MLLT3-KMT2A: *myeloid/lymphoid or mixed lineage leucemia translocated to 3-lysine methyltransferase 2A*; DEK-NUP214: gene *DEK-nucleoporin 214*; GATA2: gene *GATA binding protein 2*; MECOM: *MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1*; RBM15-MKL1: *RNA binding motif protein 15-megakaryoblastic leucemia 1*; BCR-ABL1: *B cell receptor-abelson murine leucemia viral oncogene 1* ou *Philadelphia chromosome*; NPM1: *Nucleophosmin 1*; CEBPA: *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*. Fonte: Adaptado de ARBER et al., 2016.

O diagnóstico das leucemias mieloides agudas dá-se inicialmente pelas alterações no hemograma, mielograma e biópsia de medula óssea, verificando-se leucocitose variada, presença de no mínimo 20% de blastos, anemia, sangramentos e a distribuição celular na medula. A citotóxica e citogenética complementam o diagnóstico indicando positividade para colorações como mieloperoxidase (MPO) e Sudan B Black (SBB) em alguns subtipos de LMAs e quais mutações genéticas estão presentes, definindo a estratificação de risco da doença, o prognóstico e o tratamento adequado (PETERS; ANSARI, 2011; STEPHEN et al., 2016).

O diagnóstico imunofenotípico das LMAs pela citometria de fluxo define perfis diferentes de populações celulares, que sofrem modificações na fase inicial da hematopoese ou nas fases tardias de maturação. Essas modificações podem ser analisadas quantitativa e qualitativamente por múltiplos parâmetros de expressão de antígenos, quando ligados a anticorpos monoclonais específicos, auxiliando tanto na diferenciação do tecido quanto na especificação da etapa maturativa da célula afetada (KALINA et al., 2015). Além disso, uma série de painéis permitem identificar os marcadores fenotípicos associados às LMAs, detectar marcadores de linhagem não-mieloide expressos (marcadores aberrantes) que produzem alterações moleculares, bem como analisar a ocorrência de apoptose, sinalização, ciclo celular e danos no DNA (IKOMA et al., 2014).

2.2. IMUNOMARCADORES EM LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

Os imunomarcadores ou marcadores imunofenotípicos, também conhecidos como *Clusters designations* – CDs são moléculas de superfície celular presentes nas células sanguíneas. Esta nomenclatura foi proposta para a classificação dos diversos anticorpos monoclonais contra epítomos sobre os CDs de superfície dos leucócitos. Os CDs definem o diagnóstico das LMAs, que de uma forma geral é estabelecido pela associação na diferenciação da linhagem mieloide na superfície, citoplasma ou núcleo das células jovens leucêmicas e na ausência de antígenos linfoides B ou T. Sua atuação pode ser como receptor ou ligante celular, iniciando uma cascata de sinalização que altera o seu comportamento. Utilizando a técnica da citometria de fluxo é possível distinguir as linhagens mieloides e linfoides e as leucemias agudas e leucemias minimamente diferenciadas, principalmente em situações em que a morfologia não permite um diagnóstico preciso, assim como a possibilidade de identificação dos diferentes subtipos imunológicos através de seus CDs expressos. Os principais

marcadores imunofenotípicos expressos de linhagem mieloide são CD117, CD13, CD33, CD65, anti-mieloperoxidase (anti-MPO), CD14, CD64, CD41 e CD61. Os marcadores que são expressos frequentemente ao longo da diferenciação são o CD13 e CD33 (PETERS; ANSARI, 2011; KALINA et al., 2015).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma técnica que permite a detecção de imunomarcadores nas amostras de sangue periférico, medula óssea, linfonodos, biópsias, líquido cefalorraquidiano e outras amostras de suspeita da doença (MILLER; PILISHOWSKA, 2014). Nessas amostras são empregadas reações de antígeno-anticorpo-fluocromo em uma corrente contínua de fluido. As células passam alinhadas uma a uma no meio fluido, onde são incididas por um feixe de laser, sendo dispersado frontal e lateralmente e detectado por tubos fotomultiplicadores que reconhecem diferentes intensidades de fluorescência de proteínas, glicoproteínas ou peptídeos presentes na célula. O sinal luminoso é transformado em sinal eletrônico e convertido em dados que serão analisados no computador através do software especializado, como mostra a figura 3 (HUANG et al., 2014).

Os dados gerados pela citometria de fluxo são analisados pela aplicação de regiões ou *gates*, onde são selecionados os dados de interesse e descartados os dados não relevantes. Essas regiões formam combinações que, ao serem aplicadas, tornam-se viáveis e uma imunofenotipagem detalhada de toda a população de células. Os citômetros modernos estão disponíveis com oito cores ou mais, permitindo a avaliação de dez ou mais parâmetros simultaneamente em uma única célula (TUTE, 2011).

O uso dos imunomarcadores tem o papel de ajudar na determinação da estratégia a ser utilizada no tratamento quimioterápico, assim como na seleção de células para o transplante. A quimioterapia intensiva às vezes é insuficiente, resultando em um desenvolvimento mínimo contra a doença, principalmente quando associada a comorbidades importantes e a fatores genéticos, que determinam mau prognóstico e baixa resposta ao tratamento. A resposta mínima promove uma taxa de mortalidade associada ao tratamento de 10% a 25%. (FENAUX et al., 2010). Tais informações estão em concordância com os dados do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, revelando que os pacientes com LMAs têm uma sobrevida ainda muito baixa e com poucos avanços durante anos comparado às leucemias linfoides agudas (ROSE-INMAN; KUEHL, 2014).

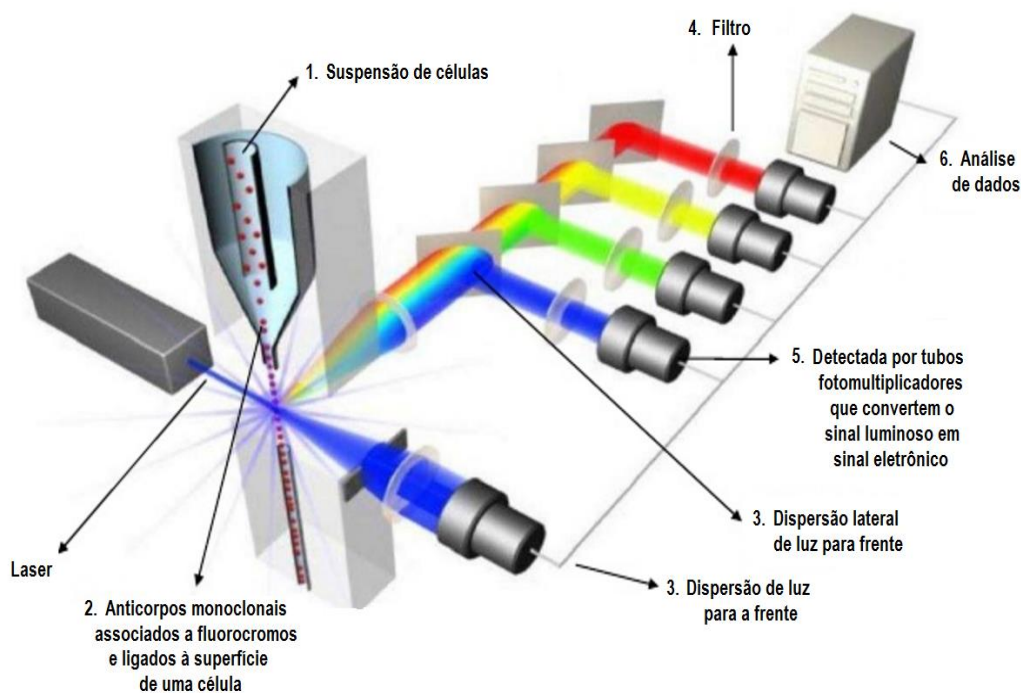


Figura 3: Esquema ilustrativo do citômetro de fluxo e seus sinais fluorescentes.

Fonte: Adaptado de <http://regmed.musc.edu/flowcytometry/flowcytometry.html>.

A utilidade da citometria de fluxo depende do painel de anticorpo escolhido, do entendimento desta metodologia e do conhecimento dos marcadores antigênicos necessários para a alta qualidade da imunofenotipagem (VAN DONGEN et al., 2012).

O Grupo Brasileiro de Citometria de Fluxo (GBCFLUX) foi fundado em 2010 com a iniciativa de promover avanços técnicos em citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) no Brasil, padronizando painéis de triagem para leucemias agudas, incluindo as leucemias mieloides agudas, visando a relação de custo-benefício para os serviços de diferentes modelos econômicos. Em 2015 o GBCFLUX padronizou os painéis que realizam a triagem das LMAs, como também painéis de combinações alternativas, importantes na identificação das subclassificações de leucemias, subtipos raros, doença residual mínima e sugerir a expressão de algumas anormalidades moleculares e citogenéticas para o prognóstico. No quadro 2 estão descritas as combinações propostas para o diagnóstico das LMAs (IKOMA et al., 2014).

Quadro 2 – Painel de triagem de leucemia mieloide aguda.

PAINEL MANDATÓRIO					
Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
HLA-DRFITC	CD16FITC	CD36FITC	CD71FITC	CD15FITC	CD2FITC
CD117PE	CD13PE	CD64PE	CD235aPE	CD61PE	CD56PE
CD45PercP	CD45PercP	CD45PercP	CD45PercP	CD45PercP	CD45PercP
CD34APC	CD11bAPC	CD14APC	CD33APC	CD13APC	CD4APC

FITC: *fluorescein isothiocyanate*; PE: *phycoerythrin*; PercP: *peridinin chlorophyll protein*; APC: *allophycocyanin*; Fonte: Adaptado de IKOMA et al., 2014.

Os painéis de diagnóstico imunofenotípico para as LMAs possuem marcadores predefinidos a mais de 20 anos e durante este tempo não houve mudança significativa no aprimoramento da estratificação desta doença. Por isso se faz necessário o estudo de novos marcadores que possam ser incluídos na rotina do diagnóstico das LMAs. Desta forma e com o aprimoramento da imunofenotipagem, será possível obter uma definição mais precisa nas medidas de tratamento e que provoquem um impacto direto na melhoria da sobrevida global e a diminuição na taxa de mortalidade nas LMAs (LARSEN et al., 2012; VAN DONGEN et al., 2012).

A pesquisa de novos marcadores vem sendo desenvolvida com o intuito de ampliar os estudos de diferenciação das células leucêmicas e sua correlação com o prognóstico e sobrevida dos pacientes com LMA. Dentre os estudos avaliados, a expressão de 7 antígenos foram encontradas e incluídas neste trabalho, sendo eles o CD87 (ATFY et al., 2011), CD135 (SHARAWAT et al., 2013), CXCR4 (MANNELLI et al., 2015), CD133 (TOLBA et al., 2013), TRAILR2 (CD262), TRAILR3 (CD263) e TNFR1 (SCHMOHL et al., 2015).

CD87: Receptor glicosilado que ligado a uma serina protease específica (uPA), inicia a conversão de plasminogênio em plasmina. O CD87 exerce vários efeitos regulatórios sobre a migração celular, adesão de leucócitos, quimiotaxia e na transdução de sinais citoplasmáticos ao citoesqueleto (ATFY et al., 2011).

A serina protease específica (uPA) promove a migração celular devido a possibilidade de iniciar a proteólise pericelular; o complexo-uPA agrupa e polariza sítios focais da célula-substrato, favorecendo a atividade da plasmina na degradação das membranas basais, facilitando o movimento celular através das barreiras do tecido. Já a quimiotaxia e adesão consiste na ligação de proteínas aos receptores dos 3 domínios ligados por dissulfureto (D1, D2 e D3), como mostrado na figura 4. Uma mudança na conformação da uPA dependente do CD87 revela esses domínios quimiotáticos, promovendo a atração de leucócitos polimorfonucleares. A adesão na matriz celular ocorre com a participação da fibronectina e vitronectina, ligantes que irão se unir ao CD87 e favorecer a adesão celular (SHEN et al., 2015).

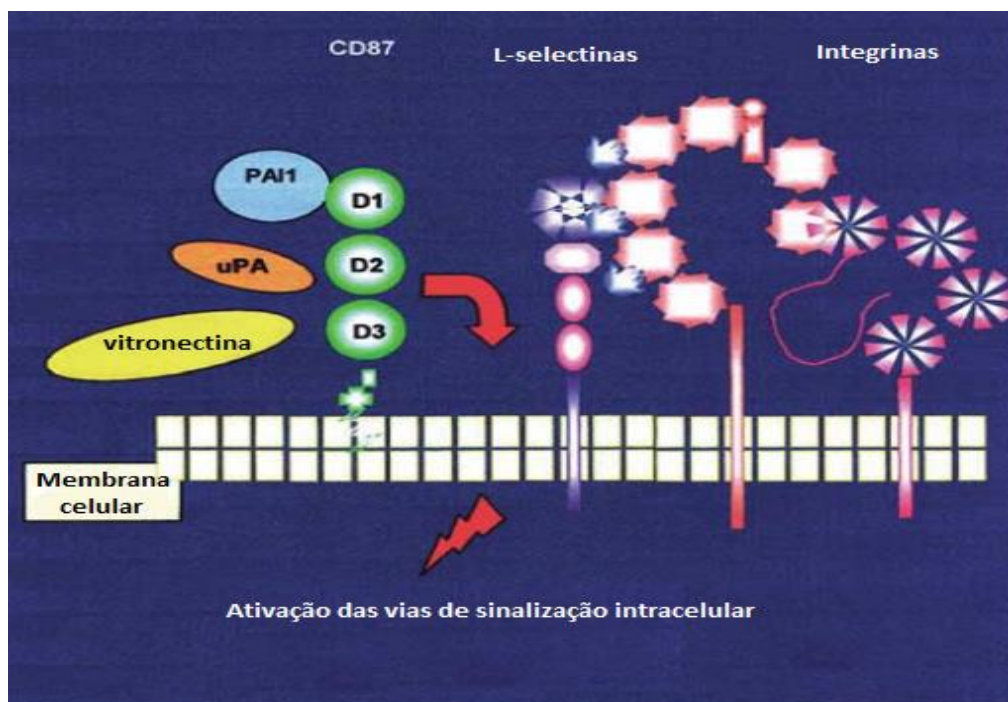


Figura 4: Representação esquemática do sistema de uPA. Fonte: Adaptado de BÉNÉ et al, 2004.

CD135 (ou FLT3 - *fms related tyrosine kinase 3*): é um receptor de tirosina-quinase (RTQ) ligado à membrana com domínios extracelular, transmembranar, justamembranar e domínio tirosina-quinase. Pertence à subfamília da classe III das RTQ e é expresso em células mieloides e progenitoras linfoides, com expressão variável em linhagem monocítica madura. A interação do receptor com o ligante FLT leva a uma alteração conformacional com exposição de um de seus domínios, dimerizando o receptor e ativando a enzima tirosina-quinase. Essa reação conduz a uma fosforilação dos sítios intracelulares e a ligação com proteínas, formando complexos proteicos, iniciando uma cascata de reações de fosforilação que ativam uma série de mediadores secundários e

promovem a transdução de sinal no núcleo. Essa série de eventos regula a diferenciação celular, proliferação e apoptose, como mostra a figura 5 (MESHINCHI; APPELBAUM, 2009).

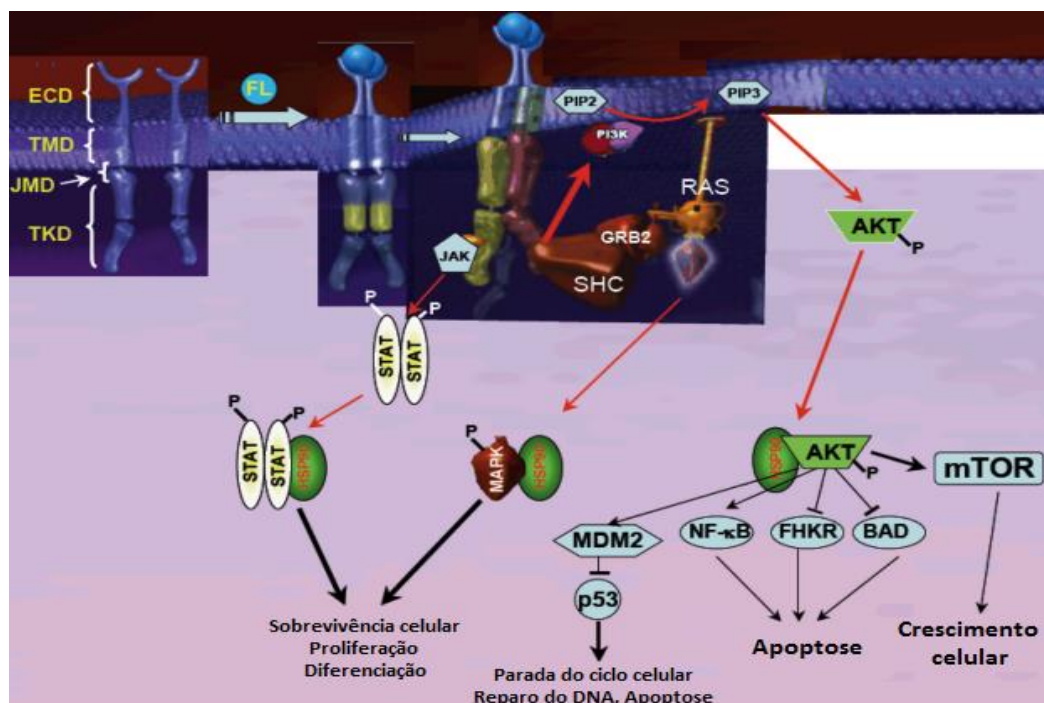


Figura 5: Via de transdução de sinal do receptor CD135 (FLT3).

FLT3: *Fms tyrosine kinase 3*; ECD: *extracellular domain*; TMD: *transmembrane domain*; JMD: *Juxtamembrane domain*; TKD: *tyrosine kinase domain*; STAT: *signal transducer and activator of transcription*; HSP90: *heat shock protein 90*; PIP2: *phosphatidylinositol biphosphate*; PIP3: *phosphatidylinositol triphosphate*; PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*; RAS: *gene RAS*; FL: *binding to FLT3 ligand*; GRB2: *Growth factor receptor-bound protein 2*; SHC: *Src homology 2 domain*; JAK: *janus kinase - protein tyrosine kinase*; PTK: *protein tyrosine kinases*; MAPK: *mitogen-active protein kinases*; MDM2: *mouse double minute 2 homolog*; p53: *tumor protein p53*; NF-κB: *factor nuclear kappa B*; FKHR: *forkhead transcription factors*; BAD: *bcl-2 associated death promoter*; mTOR: *mammalian target of rapamycin*. Fonte: Adaptado de MESHINCHI; APPELBAUM, 2009.

O CD135 desempenha um papel importante na regulação da hematopoese normal e crescimento celular. Junto com os fatores de crescimento CSF (*Colony stimulating factor*) e IL-3 (interleucina 3), promovem a proliferação de células progenitoras hematopoéticas primitivas, bem como as células comprometidas mieloides e precursores linfoides. Sua expressão foi avaliada em células leucêmicas e dados sugerem que níveis muito elevados de receptores de FLT3 podem promover a ativação típica do receptor do tipo selvagem em células malignas (SHARAWAT et al., 2013).

CXCR4: Molécula de adesão, receptor de quimiocina CXCL12 para o *stromal derived factor 1* (SDF1), que desempenha um papel no desenvolvimento da hematopoese e organização do sistema imunológico. Esses receptores são de uma família de 7 domínios transmembranares, (que estão na superfície celular acoplados a G-proteína-CXCR1 (MANNELLI et al., 2015).

As quimiocinas são proteínas pequenas que são secretadas e podem ser agrupadas em 2 subfamílias principais com base em 2 resíduos de cisteína conservados, separados por um aminoácido interveniente, representando por CXC ou quimiocinas CC. Os receptores das quimiocinas estão presentes em muitos tipos celulares. Inicialmente, foram identificados em leucócitos, desenvolvendo um papel importante no *homing* dessas células para os locais de inflamação. No entanto, durante os últimos anos, as células hematopoéticas e não-hematopoéticas foram encontradas expressando receptores para várias quimiocinas, em tecidos de microambientes diferentes. As interações entre esses receptores e suas respectivas quimiocinas ajudam a coordenar o curso e organização de células dentro de vários compartimentos dos tecidos (BAE et al., 2015).

CD133 (prominin-1): Molécula com cinco domínios transmembranares em células progenitoras hematopoéticas normais primitivas. Sua expressão está associada com as funções de crescimento celular, desenvolvimento e origem de tumores sólidos, bem como a infiltração e resistência a quimioterapia, como mostra a figura 6. A expressão de CD133 é regulada através da hipóxia em alguns tipos de tumores sólidos. Essa condição aumenta o fator de indução de hipóxia-1 α (FIH-1 α), ao qual inibe o receptor alvo da rapamicina (mTOR). A inibição aumenta ainda mais a população de células CD133 positivas e a expressão de genes em células-tronco. O início da origem tumoral é mostrado quando um número de interleucinas-8 (IL-8), responsáveis pela angiogênese tumoral são ativadas pelas células CD133 positivas, através da fosforilação de seu domínio terminal C citosólico, promovido pela proteína tirosina-quinase não-receptoras da família SRC. A fosforilação de CD133 medeia a ativação da via PI3K/AKT (*phosphatidylinositol 3-kinase/active kinase tyrosine*) em células estaminais, promovendo o início do câncer (LI, 2013).



Figura 6: Esquema funcional de células CD133+. A expressão de CD133 é dinâmica e reversível em resposta às mudanças de microambiente celular. CD133 está envolvido em diversos processos celulares, incluindo absorção de glicose e transferrina, autofagia, interação membrana-membrana, e funções de metaloproteinase de matriz. As vias do IL-8, mTOR, PI3K e MAPK são preferencialmente ativadas em células CD133+. Fonte: Adaptado de LI, 2013.

CD262 (TRAILR2 - *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand 2*), CD263 (TRAILR3 - *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand 3*) e CD120a (TNFR1 - *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*): são descritos no mesmo estudo e estão relacionados com regulação e indução de apoptose celular. CD262 é um imunomarcador expresso em células T e *Natural Killer* (NK), responsável pela indução de apoptose em células de origem linfóide. Sua regulação é expressa em células de leucemia linfóide crônica e linfoma não-Hodgkin. O CD263 é expresso em neutrófilos e granulócitos e atua sobre a regulação da apoptose por meio da atividade de ligação competitiva. O TNFR1 é um mediador de citotoxicidade, expresso em granulócitos, monócitos e linfócitos que além de mediar a indução da apoptose, também está envolvido em outras funções como ativação endotelial e adesão, proliferação de células T, dentre outros (SCHMOHL et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os estudos de coorte através da confecção de uma revisão sistemática de literatura na busca de novos marcadores imunofenotípicos, correlacionando com o prognóstico e sobrevida de leucemias mieloides agudas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evidenciar quais novos marcadores imunofenotípicos em leucemias mieloides agudas;
- Correlacionar sua expressão com sobrevida e prognóstico da doença.

4. METODOLOGIA

4.1. REVISÃO SISTEMÁTICA

Uma revisão sistemática foi utilizada com base em um protocolo de pesquisa científica descrevendo os objetivos e métodos utilizados. Esta síntese foi realizada de acordo com o *Preferred reporting items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA).

A presente revisão sistemática buscou responder à seguinte pergunta:

Existem novos marcadores imunofenotípicos que auxiliam no prognóstico e sobrevida de leucemias agudas?

4.1.1. ESTRATÉGIA DE BUSCA

Uma revisão sistemática da literatura científica foi realizada para pesquisar e identificar as publicações sobre a influência dos novos anticorpos monoclonais utilizados como marcadores imunofenotípicos no prognóstico de leucemia mieloide aguda.

A pesquisa bibliográfica foi realizada nas bases de dados Pubmed, Science Direct, Web of Science e Scopus ao longo de um período que variou entre 2012 a 2015, tendo como parâmetro os painéis imunofenotípicos publicados pelo grupo europeu Euroflow em 2012. Além disso, as listas de referências de artigos relevantes foram pesquisadas para estudos adicionais.

Foram utilizados os seguintes termos de pesquisa: Antígenos CD (MeSH) ou Antígenos de diferenciação (MeSH) ou marcadores biológicos (MeSH) ou marcadores tumorais biológicos (MeSH), prognóstico (MeSH) ou taxa de sobrevivência (MeSH) ou análise de sobrevida (MeSH) e leucemia mieloide aguda (MeSH) ou leucemia aguda, descritos nos Quadros 3, 4 e 5.

Quadro 3 – Primeiro descritor, seus sinônimos e tradução para Inglês e Espanhol

PORTUGUÊS	INGLÊS	ESPAÑHOL
Antígenos, CD	<i>Antigens, CD</i>	<i>Antígenos, CD</i>
Antígenos, diferenciação	<i>Antigens, differentiation</i>	<i>Antígenos, diferenciación</i>
Marcadores biológicos	<i>Biological Markers</i>	<i>Marcadores biológicos</i>
Marcadores biológicos de tumor	<i>Tumor Markers, biological</i>	<i>Marcadores biológicos de tumor</i>

Quadro 4 – Segundo descritor, seus sinônimos e tradução para Inglês e Espanhol

PORTUGUÊS	INGLÊS	ESPAÑHOL
Prognóstico	<i>Prognosis</i>	<i>Pronóstico</i>
Taxa de sobrevivência	<i>Survival rate</i>	<i>Taxa de supervivencia</i>
Análise de sobrevida	<i>Survival analysis</i>	<i>Análisis de supervivencia</i>

Quadro 5 – Terceiro descritor, seus sinônimos e tradução para Inglês e Espanhol

PORTUGUÊS	INGLÊS	ESPAÑHOL
Leucemia mieloide aguda	<i>Leukemia myeloid, acute</i>	<i>Leucemia mieloide aguda</i>
Leucemia aguda	<i>Acute leukemia</i>	<i>Leucemia aguda</i>

Os artigos encontrados na pesquisa foram comparados com os critérios de inclusão previamente definidos para determinar a relevância do estudo: (i) publicados entre janeiro de 2012 a setembro de 2015; (ii) Publicada em Inglês, Espanhol e Português; (iii) Usando imunofenotipagem na sua metodologia (iv) discutindo leucemia mieloide aguda; (v) com resumo e texto completo disponível; (vii) estudos de coorte. O critério de exclusão utilizado no estudo foi: (i) anticorpos monoclonais que não estão

incluídos nos painéis de imunofenotipagem para LMA definido pelo grupo europeu Euroflow.

Relatos de caso, estudos transversais, revisões sistemáticas e de literatura, metanálises, editoriais, anais de conferências, ensaios clínicos, overview, estudos de caso e livros foram excluídos.

Dois revisores rastrearam todos os artigos identificados através da estratégia de pesquisa usada e foram aplicados os critérios de inclusão. Em caso de divergências entre os dois revisores, um terceiro revisor inspecionou o texto completo.

A pesquisa preliminar foi feita em títulos e resumos, selecionando os estudos relevantes sobre o assunto. A seleção dos itens foi feita manualmente, lendo-se todos os títulos e resumos para que não houvesse risco de que qualquer material importante sobre o assunto não fosse incluído. Também foi realizada uma busca manual da lista de referências dos trabalhos selecionados. A partir de artigos indexados em mais de um banco de dados, apenas um foi considerado, excluindo os outros.

4.1.2. AVALIAÇÃO DA EXEQUIBILIDADE DOS ESTUDOS INDIVIDUAIS

A exequibilidade metodológica de cada estudo individual foi avaliada utilizando o *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE), composto por 22 itens. As pontuações gerais de qualidade variaram de 91% a 95,4% dos 22 itens listados. Baixas pontuações significaram que não havia informação suficiente e um bom projeto.

Os artigos encontrados nas buscas foram comparados com os critérios de inclusão previamente definidos para determinar a relevância do estudo: (1) Artigos publicados a partir de 2012; (2) Artigos publicados em inglês, espanhol e português; (3) Artigos se tratando de anticorpos monoclonais não incluídos nos painéis para imunofenotipagem de LMAs definido pelo grupo europeu Euroflow; (4) Artigos se tratando de leucemias mieloides agudas. Relatos de caso, estudos transversais, revisões de literatura e sistemáticas, metanálises, editoriais, anais de congresso, relatos de caso, casos clínicos e livros foram excluídos do estudo.

4.1.3. COLETA DE DADOS

A partir dos estudos incluídos foram coletadas as informações: (i) Jornal de publicação; (ii) Local onde o estudo foi realizado; (iii) Objetivo do estudo; (iv) Marcador imunofenotípico estudado; (v) Subtipo de LMA; (vi) Valor do prognóstico; e

(vii) Limitações encontradas foram obtidas pelos dois revisores (AF, DL) de forma independente. Em caso de divergências, o terceiro revisor (DMS) extraiu e analisou os dados e decidiu se o estudo foi incluído ou não. Para textos completos e dados não acessíveis ou incompletos, os autores foram contactados.

Posteriormente os dados extraídos de cada estudo foi descrito em forma de tabela, usando títulos de resumo. A seleção final dos artigos pertinentes foi feita por todos os autores por meio de consenso.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Os resultados do procedimento de seleção de estudo estão descritos na Figura 7. A busca na literatura resultou em 9950 artigos. Um total de 12 estudos foram incluídos na revisão, onde um deles foi encontrado após uma revista manual nas listas de referência.

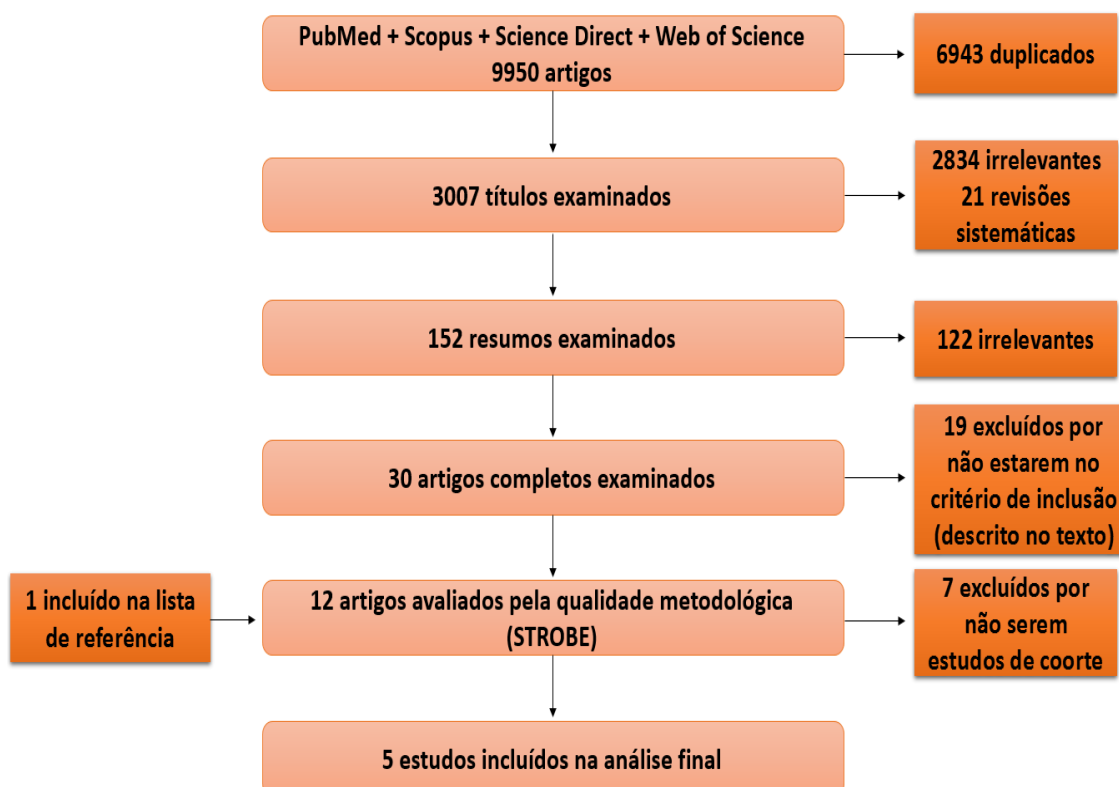


Figura 7. Fluxograma linear do artigo adaptado do PRISMA.

Para este trabalho só foram considerados os estudos de coorte dentre os artigos finais. Os outros estudos foram excluídos pois não relatavam influência na sobrevida global dos pacientes, restando somente 5 artigos.

5.2. CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS

As características gerais dos cinco estudos de coorte estão descritas de forma resumida na tabela 1.

Os estudos foram fundamentados em associar a expressão dos imunomarcadores com o prognóstico e sobrevida dos pacientes. A expressão de 7 antígenos foi avaliada em todos os artigos inclusos neste trabalho, que são os CD87 (ATFY et al., 2011), CD135 (SHARAWAT et al., 2013), CXCR4 (MANNELLI et al., 2015), CD133 (TOLBA et al., 2013), TRAILR2 (CD262), TRAILR3 (CD263) e TNFR1 (SCHMOHL et al., 2015).

O número de pacientes investigados nos estudos variou de 46 a 142. Um total de 473 amostras hematológicas foram analisadas em todos os estudos incluídos. A média do seguimento de todos os artigos foi de 12 meses. Apenas um artigo relata amostras analisadas de crianças. Três estudos utilizaram a classificação do grupo Franco-Americana-Britânica (FAB) (TOLBA et al., 2013; MANNELLI et al., 2015; SCHMOHL et al., 2015) e dois usaram tanto a FAB quanto a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (AFTY et al., 2011; SHARAWAT et al., 2013) para os subtipos de LMA. Os subtipos mais relatados nos artigos foram LMA M2 FAB seguido por LMA M4 FAB. Somente um artigo não informou o subtipo de LMA (TOLBA et al., 2013).

Em relação a revista, foram encontrados dois artigos publicados na *Cytometry Part B*, dois na *Medical Oncology* e um na *Anticancer Research*. O fator de impacto *Journal Citation Reports* (JCR) das revistas encontradas na pesquisa variou de 1,826 a 2,634. A maioria dos estudos foi realizada em países com alto desenvolvimento científico e tecnológico, especialmente EUA e Alemanha. Para garantir a exequibilidade metodológica dos estudos observacionais, a ferramenta STROBE foi utilizada avaliando os 5 artigos em uma escala de 0% a 100%, de acordo com a compatibilidade com os itens anteriormente descritos. Todos os artigos marcaram mais de 90%. Dois artigos marcaram 20 pontos equivalentes a 91% e 3 artigos marcaram 21 pontos equivalentes a 95,4%, o que mostra alta exequibilidade metodológica em todos os estudos incluídos.

Tabela 1: Características gerais dos estudos de coorte

AcMo	ARTIGO	REVISTA DE PUBLICAÇÃO	LOCAL DO ESTUDO	TAMANHO DA AMOSTRA	PROPÓSITO DO ESTUDO	CLASSIFICAÇÃO LMA - FAB	INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO	SCORE STROBE
CXCR4	MANNELLI et al., 2015	Cytometry Part B: Clinical Cytometry	Itália	142 pacientes	O objetivo do estudo foi correlacionar a expressão CXCR4 em células leucêmicas com características clínico-biológicas e resultado em um coorte adultos homogeneamente tratados de pacientes com LMA.	LMA M2 e LMA M4	Mau prognóstico	21 (95,4%)
TRAILR1-R3, TNFR1 and FAS	SCHMOHL et al., 2015	Anticancer Research	Alemanha	46 pacientes	O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação de co-expressão de TRAILR1-3, TNFR1 e FAS em explosões de LMA no primeiro diagnóstico com diferentes subtipos e grupos de risco em LMA e combinar estes resultados com os dados clínicos, a fim de avaliar seu significado prognóstico e clínica.	LMA M2	TRAILR-2: mau prognóstico; TRAILR-3: bom prognóstico; TNFR1: mau prognóstico	21 (95,4%)
CD 133	TOLBA et al., 2013	Medical Oncology	EUA	60 pacientes	O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão CD133 em pacientes com leucemia mieloide aguda ou leucemia linfoblástica e avaliar sua correlação com os diferentes dados clínicos e laboratoriais, bem como sua relação com a evolução da doença.	NR	Mau prognóstico	20 (91%)
CD135	SHARAWAT et al., 2013	Cytometry Part B: Clinical Cytometry	Índia	115 pacientes	O objetivo deste estudo foi avaliar a significância clínica de FLT3 (CD135) e a expressão de c-KIT (CD117) em mieloblastos na LMA.	M2	Mau prognóstico	21 (95,4%)
CD87	ATFY et al., 2011	Medical Oncology	Alemanha	110 pacientes	Os objetivos deste estudo foram descobrir o significado prognóstico da detecção de pré-tratamento de CD87 e estudar a prevalência de expressão CD87 e seu valor como preditor de sobrevida em pacientes com LMA.	M4	Mau prognóstico	20 (91%)

LMA: leucemia mieloide aguda; AcMo: anticorpo monoclonal; CXCR4: receptor de quimiocina CXC4; TRAILR1-R3: *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* 1-3; TNFR1: *Tumor Necrosis Factor Receptor* 1; FAS: antígeno de apoptose 1 (APO-1 ou CD95); FLT3 - *fms related tyrosine kinase* 3; NR: Não relatado.

5.3. A INFLUÊNCIA DOS MARCADORES NO PROGNÓSTICO E NA SOBREVIDA GLOBAL

Os artigos estudados neste trabalho observaram que a expressão dos novos imunomarcadores pesquisados tem um impacto negativo no prognóstico da LMA. Somente um artigo mostrou que o CD263 tem um valor positivo no prognóstico. Em relação a sobrevida, os cinco artigos mostraram uma sobrevida diminuída relacionada com a alta expressão dos imunomarcadores analisados.

5.3.1. CD87

O artigo mostrou que a expressão de CD87 em pacientes portadores de LMA com diferenciação monocítica é alta e encontrada em 21/33 (LMA M4) e 14/22 (LMA M5) dos casos. Houve diferenças significativas quanto a baixa expressão de CD87 comparado com a alta expressão de CD87 em LMA M4 ($P = 0,048$) e em casos de LMA M5 ($P = 0,0243$). Estes resultados mostram que a associação entre a expressão do CD87 e a série monocítica de LMA pode ser vantajosa para confirmar o diagnóstico da LMA em casos difíceis, onde é necessário avaliar a detecção de doença residual mínima em estudos prospectivos.

Um estudo semelhante detectou que blastos de LMA exibiam um padrão de expressão heterogêneo de CD87, com reatividade estritamente dependente do tipo de célula envolvida (monocítica ou granulocítica), e na sua maturação foi observada uma maior taxa de expressão de CD87 em LMA monoblástica e uma menor taxa em pacientes com LMA indiferenciada (subtipo M0) (BÉNÉ et al., 2004).

O artigo estudado observou que a alta expressão de CD87 em células de LMA foi correlacionada com tempo de sobrevida global mais curto do que a sua baixa expressão ($P=0,0188$), como mostra a figura 8, confirmando assim os dados reportados por outros autores que relacionaram a expressão de CD87 a tumores sólidos, uma vez que facilitava a invasão tumoral e metástase dos mesmos. As observações também sugerem que a alta expressão de CD87 associada com sinais clínicos preveem um curso mais agressivo da doença, caracterizando um mau prognóstico, sendo um importante marcador de prognóstico na LMA.

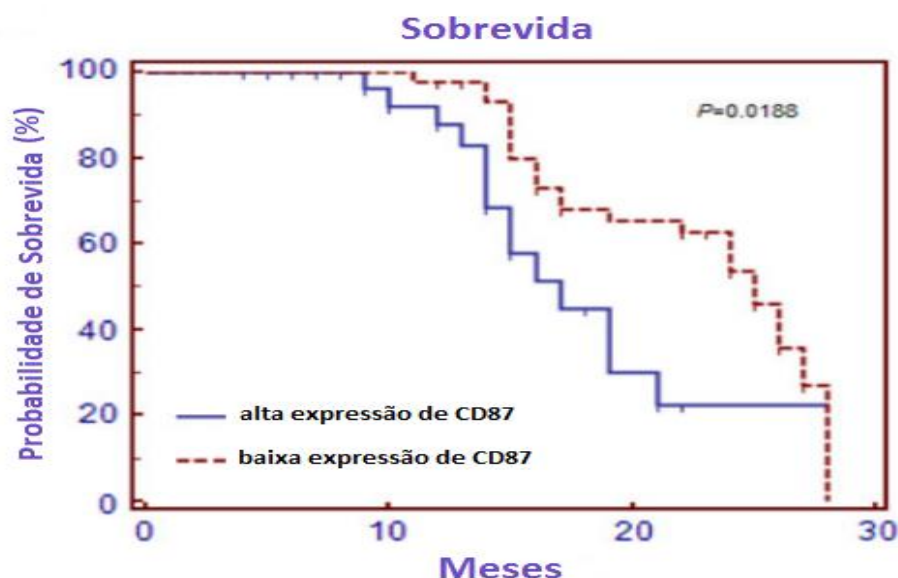


Figura 8: Impactos da expressão de antígenos em relação às expressões CD87 sobre a sobrevida global. Fonte: Adaptado de ATFY et al, 2011.

5.3.2. CD135

O estudo analisado foi o único a mostrar a avaliação de CD135 tanto individual quanto associado a outro receptor de tirosina-quinase (CD117) em mieloblastos. Sua expressão foi observada em 82% dos casos de LMA. O artigo concluiu que a sua expressão está associada a uma diminuição tanto da sobrevida livre de doença quanto na sobrevida global (figura 9), estando relacionando à diminuição da contagem média das hemoglobinas e maior número de blastos leucêmicos, possuindo um pior prognóstico.

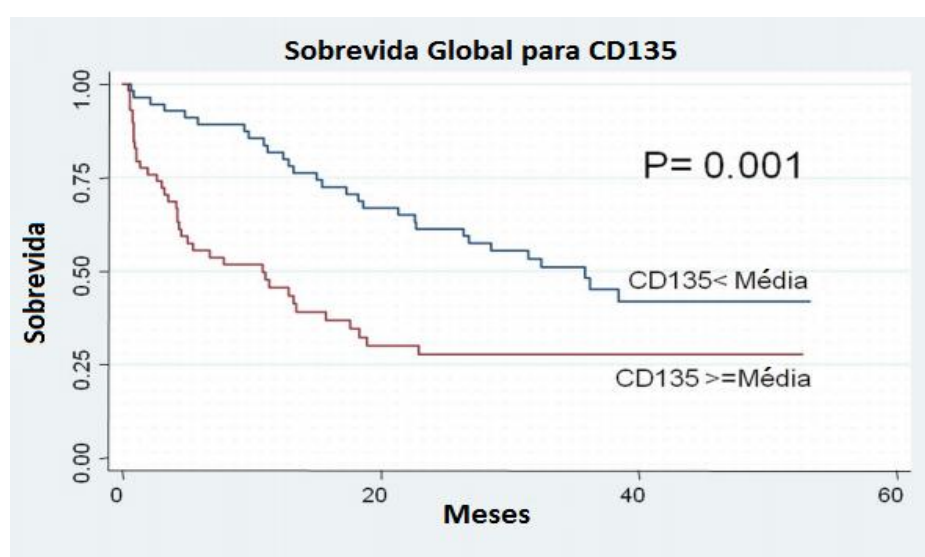


Figura 9: curva de Kaplan-Meier de CD135 para sobrevida global. Fonte: Adaptado de SHARAWAT et al, 2013.

O envolvimento da expressão do CD135 no desenvolvimento da maioria das leucemias, incluindo nas LMAs foi descrito em outro estudo, em que mutações genéticas associadas à sua expressão são frequentemente encontradas. A mutação mais encontrada nos pacientes deste estudo foram as duplicações internas em tandem (ITD). Os pacientes com e sem mutação CD135-ITD em LMA apresentaram altos níveis de proteínas fosforiladas derivadas do CD135, as quais foram associadas a um menor período de remissão. Uma forte evidência na co-expressão do receptor CD135 com seu ligante também foi relatada, assim como a ativação do gene tipo selvagem de CD135, contribuindo na sinalização da leucemogênese (VORA et al., 2010).

5.3.3. CXCR4

O artigo mostrou que 142 pacientes com LMA, de idade média de 54 (18-65) anos foram estudados com relação a expressão de CXCR4. Houve separação em dois grupos, os que apresentavam alta expressão de CXCR4 (grupo A) e os que apresentavam baixa expressão de CXCR4 (grupo B). O grupo A apresentou características clínicas como aumento de glóbulos brancos, aumento de lactato desidrogenase (LDH), maior contagem de plaquetas, maior incidência de subtipos de LMA M4-M5 e maior incidência de hepatoesplenomegalia e/ou doença extra-hematológica do que o grupo B. A análise do estudo mostrou através da *mean fluorescence intensity* (MFI) que as células CD34+ possuem uma correlação entre a expressão mais elevada de CXCR4, a sobrevida livre da doença e a sobrevida global. Nessa análise foram incluídos os principais fatores prognósticos, como a idade, a contagem de leucócitos e cariótipo com expressão de FLT3 / NPM1. Dentre eles, a contagem de leucócitos e expressão de FLT3-ITD tem impacto na sobrevida livre da doença, enquanto a idade e o cariótipo afetam a sobrevida global, contribuindo com sua diminuição e um prognóstico desfavorável, mostrado na figura 10.

O estudo de HERHAUS e colaboradores (2016) relatou que o CXCR4 é amplamente expresso em células de ambos os sistemas imune e nervoso central e podem mediar a migração de leucócitos e células progenitoras hematopoéticas em resposta ao seu ligante, *stromal derived factor 1* (SDF-1). Em adição à expressão aberrante de CXCR4, em pacientes com LMA ocorre uma fosforilação mediada pelo ligante de serina 339 do CXCR4, que parece gerar resistência à quimioterapia e aumentar a retenção de células de LMA dentro da medula óssea.

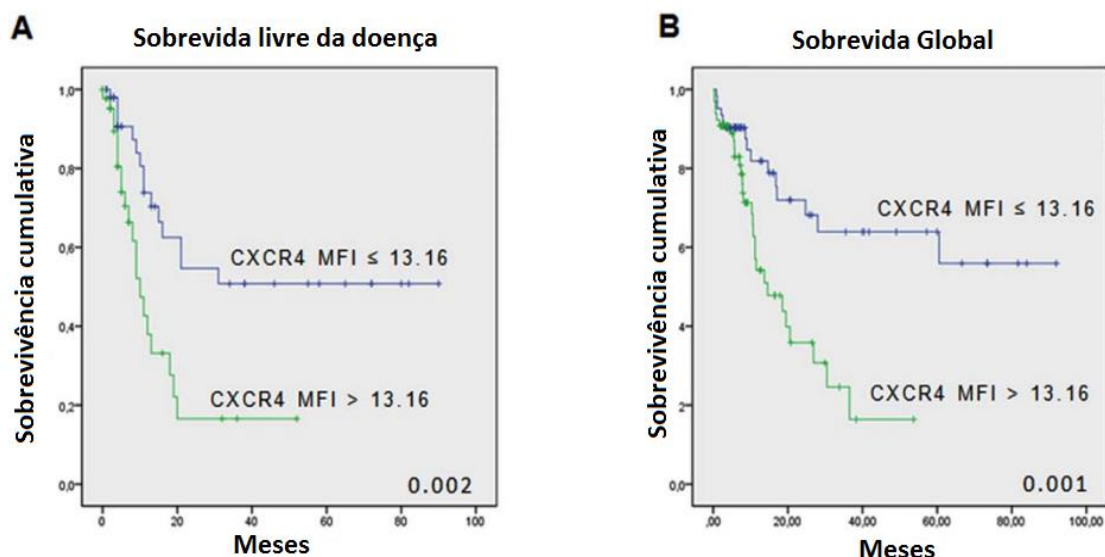


Figura 10: (A) Sobrevida livre de doença e (B) A sobrevivência global de acordo com imunofluorescência (*mean fluorescence intensity* –MFI) de CXCR4 em toda a população leucêmica acima ou abaixo-igual do valor mediano de MFI. Fonte: Adaptado de MANNELLI et al, 2015.

Essa retenção aumentada, principalmente pelos osteoblastos diferenciados no nicho da medula foi recentemente mostrada neutralizando a indução de apoptose dentro do compartimento leucêmico, desencadeado pelo ligante do CXCR4.

A avaliação de outro estudo relata que a sobrevivida livre da doença em LMA continua baixa devido a recaída que ocorre pela presença da doença residual mínima (DRM). A medula é considerada o principal local para a DRM, onde a adesão de elementos do estroma protege as células leucêmicas dos efeitos dos medicamentos. Algumas moléculas de adesão, como a do antígeno muito tardio (VLA)-4 são integrinas que desempenham um papel importante em células leucêmicas. O CXCR4 pode facilitar o VLA-4 que, por sinalização, induz a migração espontânea de células de LMA sob as células estromais da medula. Na adesão à fibronectina no estroma da medula, as células de LMA se tornam resistentes à apoptose espontânea ou a indução por drogas. Sequencialmente as moléculas de adesão e CXCR4 parecem ser os reguladores centrais de sinais de sobrevivida, sendo responsáveis pela resistência às terapias antineoplásicas. Este pensamento tem suporte por causa da alta expressão de CXCR4 por células leucêmicas, sendo um indicador de prognóstico desfavorável em LMA (BAE et al., 2015).

5.3.4. CD133

Segundo o estudo, 30 pacientes com LMA recém-diagnosticados foram incluídos, sendo 15 mulheres e 15 homens, com idades entre 17 a 66 anos. Do grupo, 19/30 (63,3%) pacientes apresentaram boa resposta à quimioterapia e alcançaram a remissão completa até o final do período de acompanhamento (12 meses), 6/30 (20%) pacientes morreram e 5/30 (16,7%) pacientes apresentaram resistência à quimioterapia. Foi observado uma correlação expressiva de CD133 com os casos de resistência à quimioterapia. A curva de Kaplan-Meier mostrada na figura 11 demonstrou que o aumento da CD133 leva a diminuição do tempo de sobrevida dos pacientes com LMA, consequentemente a um mau prognóstico.

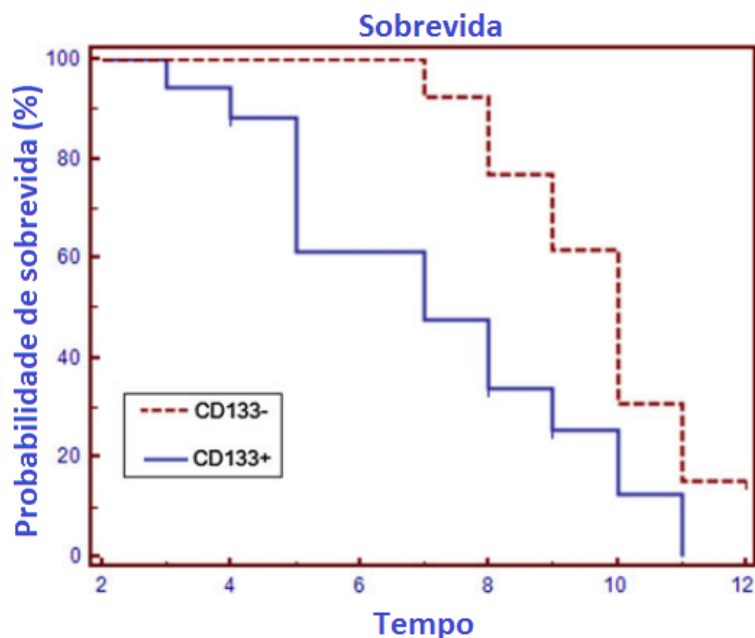


Figura 11: Curva de Kaplan-Meier comparando a sobrevida com base na expressão de CD133+ ou CD133- em pacientes com LMA. Fonte: Adaptado de TOLBA et al, 2013.

O imunomarcador CD133 é expresso de forma seletiva em células imaturas, que ainda possuem a expressão do CD34 positivo. Por esta característica foi sugerido que o CD133 seja um marcador imunológico de prognóstico importante para os subtipos de leucemias mieloides indiferenciadas. Existem também uma associação significativa entre o imunomarcador de origem mieloide CD13 e a expressão de CD133 ($<0,01$), indicando uma relação proporcional direta entre os dois, sugerindo seu uso futuramente como marcador mieloide.

5.3.5. TRAILR2 (CD262), TRAILR3 (CD263) e TNFR1

A avaliação do prognóstico foi feita em uma comparação por grupos de risco através da *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)/European Leukemia Network (ELN)*. A expressão de CD262 foi evidentemente mais elevada nas amostras de pacientes do grupo de risco adverso em relação ao grupo favorável (3.85 vs. 2.0, $p=0.01$), o que foi confirmado comparando-se o grupo de risco adverso com o de risco intermediário (3.85 vs. 2.05; $p=0.004$), revelando ser um indicador de mau prognóstico. A expressão do CD263 foi avaliada comparando-se os casos de risco favorável aos casos de risco intermediário, onde o último mostrou uma expressão mais alta (2.2 vs. 3.5, $p=0.02$). A diferença entre os valores na expressão de TNFR1 entre os casos de risco favorável e risco intermediário foi considerada insignificante. O estudo mostrou uma maior probabilidade de recidiva de pacientes em casos de alta expressão de CD262 e TNFR1 e de menor expressão de CD263.

Análises de corte foram feitas para prever o prognóstico em relação a grupos de sobrevida global mais curto e mais longo. Os resultados da alta expressão de CD262 foram associados ao prognóstico desfavorável, sobrevida global baixa e menor resposta à terapia. A expressão de proteínas envolvidas na apoptose das células são controladas pela via do CD262, que pode ser sensibilizada na leucemia, levando a uma regulação deficiente ou a falta da apoptose. Para o CD263, as análises de corte mostraram que o grupo com maior expressão de CD263 obteve tempo de atraso para a recaída, aumentando a sobrevida global, porém não foi realizado a curva Kaplan–Meier para demonstrar esse resultado.

Em contraste, outro estudo sobre CD263 mostrou que os receptores de morte funcional possuem domínios que iniciam a cascata apoptótica, porém no receptor CD263 falta um domínio, por isso o mesmo funciona como um receptor antagônico. A ligação com esse receptor não irá induzir a apoptose, pois o mesmo irá inibir esse processo de maneiras distintas. Foi realizada uma análise sobre a expressão do receptor de blastos leucêmicos por um grande estudo de coorte em pacientes com LMA, comparando-os com os níveis de expressão em doadores saudáveis e correlacionando com a evolução clínica. Verificou-se uma elevada expressão do CD263 com um resultado clínico pobre. E uma análise univariada determinou-se um perfil pró ou anti-apoptótico de blastos leucêmicos e correlacionou-os com a sobrevida global. Os pacientes obtiveram $>25\%$ (média + 2 vezes o desvio padrão) de blastos leucêmicos

anti-apoptóticos positivos para CD263, obtendo uma redução da sobrevida global como mostra a figura 12 (CHAMULEAU et al, 2011).

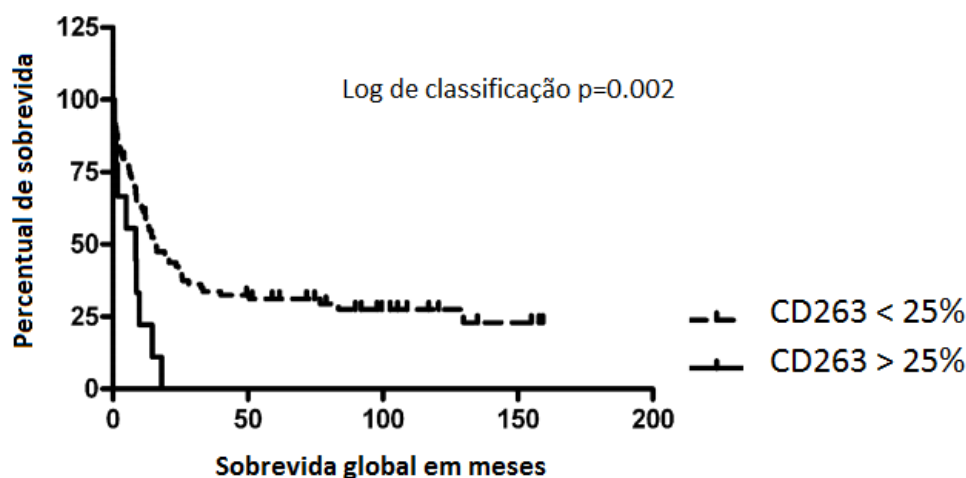


Figura 12: Curva de sobrevida Kaplan-Meier de 92 novos pacientes com LMA. Os pacientes nos quais > 25% (média valor normal + 2 DP*) de blastos leucêmicos foram positivos para CD263 tinham uma sobrevida global significativamente reduzida ($p = 0,002$).

Fonte: Adaptado de CHAMULEAU et al, 2011.

A alta expressão de TNFR1 mostrou uma relação com a diminuição da sobrevida global, contribuindo para o crescimento impulsionado de TNF e estimulando a proliferação de granulócitos/macrófagos através da ação da interleucina-3 (IL-3) e do fator estimulante de colônia (CSF). Esse estímulo leva a um crescimento de células leucêmicas, desempenhando um papel na iniciação e progressão de blastos de LMA.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leucemias mieloides agudas são doenças heterogêneas com protocolos terapêuticos muito semelhantes por quimioterapia intensiva, o que geralmente acaba por ser ineficaz, principalmente quando associado a fatores como comorbidades, mutações genéticas, idade avançada e baixa tolerabilidade ao tratamento, provocando assim, alto índice de mortalidade. O estudo de novos marcadores imunofenotípicos nas LMAs traz à luz possíveis novas estratégias terapêuticas mais precisas, bem como a elucidar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos pelas células neoplásicas, sendo de grande valia para o impacto na sobrevida global dos pacientes e na probabilidade de cura dessas neoplasias.

Os marcadores CD87, CD135, CXCR4, CD133, TRAILR2 (CD262), TRAILR3 (CD263) e TNFR1 encontrados nos estudos avaliados mostraram importância no valor do prognóstico das leucemias mieloides agudas. Dos sete marcadores imunofenotípicos avaliados, 85,7% mostraram mau prognóstico da doença em sua expressão, correlacionando com a diminuição da sobrevida global, enquanto somente o TRAILR3 (CD263) mostrou bom prognóstico e aumento da sobrevida global com relação a sua expressão. A maioria dos imunomarcadores relatados neste trabalho é expresso em funções celulares importantes, como adesão, apoptose e leucemogênese, o que pode auxiliar na conexão destes mecanismos envolvidos com a evolução da doença.

O CD87 mostrou forte ligação com a linhagem monocítica das LMAs, auxiliando na estratificação desse subtipo em casos difíceis que precisem de avaliação sobre a possibilidade de doença residual mínima. Já o CXCR4 pode ser um alvo terapêutico em casos de LMA com resistência à terapia. O CD133 mostrou ser um marcador seletivo para células indiferenciadas, podendo auxiliar na diferenciação das LMAs desse subtipo e ser um forte candidato a um marcador mieloide. O CD262 mostrou sua relação com prognóstico desfavorável quando altamente expresso, tornando as vias de apoptose deficientes para os blastos leucêmicos. É necessário mais estudos sobre o CD263 que mostrou aumento da sobrevida global, porém sem detalhes sobre seu funcionamento ao atraso da recaída da doença.

Diante do exposto, o estudo de novos imunomarcadores pode ser uma alternativa para o prognóstico mais conciso das LMAs, o que proverá dados importantes relacionados à expressão desses antígenos e que pode estar diretamente associada à heterogeneidade funcional das células afetadas, consequentemente à resposta terapêutica e a sobrevida dos pacientes com LMA.

7. REFERÊNCIAS

ALLEGRA, A. et al. The metabolomic signature of hematologic malignancies. **Leukemia Research**. v. 49, p. 22-35, 2016.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 2016.

ATFY, M. et al. Role of urokinase plasminogen activator receptor (CD87) as a

prognostic marker in acute myeloid leukemia. **Medical Oncology**, v. 29, n. 3, p. 2063–2069, 2012.

BAE, M. H. et al. VLA-4 and CXCR4 expression levels show contrasting prognostic impact (favorable and unfavorable, respectively) in acute myeloid leukemia. **Annals of Hematology**, v. 94, n. 10, p. 1631–1638, 2015.

BAIN, B. J.; ESTCOURT, L. FAB Classification of Leukemia. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**, v. 3, p. 5-7, 2013.

BÉNÉ, M. C. et al. CD87 (urokinase-type plasminogen activator receptor), function and pathology in hematological disorders: a review. **Leukemia**, v. 18, n. 3, p. 394–400, 2004.

CHAMULEAU, M. E. D. et al. High TRAIL-R3 expression on leukemic blasts is associated with poor outcome and induces apoptosis-resistance which can be overcome by targeting TRAIL-R2. **Leukemia Research**, v. 35, n. 6, p. 741–749, 2011.

FENAUX, P. et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 4, p. 562–569, 2010.

FU, Y. et al. Clinical significance of lymphoid enhancer-binding factor 1 expression in acute myeloid leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 55, n. 2, p. 371–7, 2014.

GALLIPOLI, P. et al. Epigenetic regulators as promising therapeutic targets in acute myeloid leukemia. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 6, n. 3, p. 103-119, 2015.

HERHAUS, P. et al. Targeted positron emission tomography imaging of CXCR4 expression in patients with acute myeloid leukemia. **Haematologica**, p.1-12, 2016.

HUANG, X. et al. A robust recognition error recovery for micro-flow cytometer by machine-learning enhanced single-frame super-resolution processing. **Integration, the VLSI Journal**, v. 51, p. 1-11, 2014.

IKOMA, M.R.V. et al. First proposed panels on acute leukemia for four-color immunophenotyping by flow cytometry from the Brazilian group of flow cytometry-GBCFLUX. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 88, n. 3, p. 194-203, 2015.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/mapa.asp?ID=8>> Acesso: 20 Março 2016.

KALINA, T. et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: Summary results of four-year (2010-2013) quality assurance rounds. **Cytometry Part A**, v. 87, n. 2, p. 145–156, 2015.

KEOHANE, E. M.; SMITH, L. J.; WALENGA, J. M. RODAK's Hematology. Clinical principles and applications. **Ed. Elsevier**, p. 604-618, 2015.

KOUCHKOVSKY, I; ABDUL-HAY, M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. **Blood Cancer Journal**. v. 6, e. 441, p. 1-10, 2016.

KRAUSE, D. S. SCADDEN, D. T. A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms. **Haematologica**. v. 100, n. 10, p. 1376-1387, 2016.

LARSEN, H. et al. Expression of the hMICL in acute myeloid leukemia-a highly reliable disease marker at diagnosis and during follow-up. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 82 B, n. 1, p. 3–8, 2012.

LI, Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. **Experimental hematology & oncology**, v. 2, n. 1, p. 17, 2013.

MANNELLI, F. et al. CXCR4 expression accounts for clinical phenotype and outcome in acute myeloid leukemia. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 86, n. 5, p. 340–349, 2014.

MESHINCHI, S.; APPELBAUM, F. R. Structural and functional Alterations of FLT3

in Acute Myeloid. Leukemia. **Clinical Cancer Res.** v. 15, n. 13, p. 4263-4269, 2009.

MILLER, K.; PILISHOWSKA, M. Acute Myeloid Leukemia. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 3ª Ed., 2014.

PEREIRA, W A; MESQUITA, E. M. Vírus linfotrópico de células t humana (htlv): doenças associadas e dificuldades no diagnóstico e tratamento. **Ciências Saúde**, São Luís, v.17, n.1, p. 40-46, 2015.

PETERS, J. M.; ANSARI, M. Q. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 135, n. 1, p. 44–54, 2011.

RAJABLI, N. et al. Epidemiology of Leukemia and Multiple Myeloma in Golestan, Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p.2333-2336, 2013.

ROSE-INMAN, H.; KUEHL, D. Acute leukemia. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, n. 3, p. 579–596, 2014.

SCHMOHL, J. U. et al. Death receptor expression on blasts in AML is associated with unfavorable prognosis. **Anticancer Research**, v. 35, n. 7, p. 4043–4052, 2015.

SCHNEIDER, T. et al. Flow cytometric maturity score as a novel prognostic parameter in patients with acute myeloid leukemia. **Annals of Hematology**. p. 1-9, 2015

SHARAWAT, S. K. et al. Increased coexpression of c-KIT and FLT3 receptors on myeloblasts: Independent predictor of poor outcome in pediatric acute myeloid leukemia. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 84, n. 6, p. 390–397, 2013.

SHEN Q. et al. Analysis of soluble urokinase plasminogen activator receptor in multiple myeloma for predicting prognosis. **Oncology Letters**, v. 10, n. 4, p. 2403–2409, 2015.

SOUTO, E. X. et al. Leucemias Mieloides Agudas. In: SALES, M. M.; MORAES-

VASCONCELOS, D. (Eds.) Citometria de Fluxo: Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa. **Atheneu**, 1ª Ed. São Paulo, p. 122, 2013.

STEPHEN, A. S.; SANJAY, R. M.; MICHAEL, R. S. Unfavorable-risk acute myeloid leukemia dissected. **Current Opinion**. v. 23, n. 2, p. 144-149, 2016.

TERWIJN, M. et al. High Prognostic Impact of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia: Data From the HOVON/SAKK AML 42A Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, 2013.

TOLBA, F. M. et al. Expression of CD133 in acute leukemia. **Medical Oncology**, v. 30, n. 2, 2013.

TUTE, R. M. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. **Histopathology**, v. 58, n. 1, p. 90–105, 2011.

VAN DONGEN, J. J. M. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1908–1975, 2012.

VORA, H. H. et al. Clinical relevance of FLT3 receptor protein expression in Indian patients with acute leukemia. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 6, n. 4, p. 306–319, 2010.